

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-304987

(43)Date of publication of application : 19.11.1993

(51)Int.Cl.

C12P 21/08  
A61K 39/395  
C12N 5/28  
C12N 15/13  
// A61B 10/00  
C12N 15/08  
G01N 33/577  
(C12P 21/08  
C12R 1:91 )

BEST AVAILABLE COPY

(21)Application number : 04-162849

(71)Applicant : MITSUBISHI KASEI CORP

(22)Date of filing : 22.06.1992

(72)Inventor : HOSOKAWA SEIKO  
TAGAWA TOSHIKI  
HIRAKAWA YOKO  
ITO NORIHIKO  
NAGAIKE KAZUHIRO

(30)Priority

Priority number : 03158859	Priority date : 28.06.1991	Priority country : JP
03158860	28.06.1991	
03158861	28.06.1991	JP
		JP

(54) HUMAN TYPE MONOCLONAL ANTIBODY AND GENE CODING THE SAME, HYBRIDOMA AND ANTITUMOR AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the novel monoclonal antibody useful for producing an antitumor agent by bonding the antibody to a liposome in which a carcinostatic agent is emcapsuled.

CONSTITUTION: The human type monoclonal antibody, e.g. GAH antibody (IgG), is produced by the cell fusion of a cancer patient-originated lymphocyte with a mouse myeloma cell, and specifically binds to the membrane surface antigen of a cancer cell. An example of antigen is produced by culturing a hybridoma GAH prepared by fusing the mouse myeloma cell with the lymphocyte originated from a lymph node belonging to the cancer site of the cancer patient.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]	23.05.1996
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	15.12.1998
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	
[Date of final disposal for application]	
[Patent number]	3236667
[Date of registration]	28.09.2001
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	11-00959
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	14.01.1999
[Date of extinction of right]	



(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-304987

(43)公開日 平成5年(1993)11月19日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	E I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 39/395	A D U T	9284-4C		
C 1 2 N 5/28		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数29(全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-162849

(22)出願日 平成4年(1992)6月22日

(31)優先権主張番号 特願平3-158859

(32)優先日 平3(1991)6月28日

(33)優先権主張国 日本(J P)

(31)優先権主張番号 特願平3-158860

(32)優先日 平3(1991)6月28日

(33)優先権主張国 日本(J P)

(31)優先権主張番号 特願平3-158861

(32)優先日 平3(1991)6月28日

(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000005968

三菱化成株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 細川 斉子

神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三  
菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 田川 俊明

神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三  
菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 平川 容子

神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三  
菱化成株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 長谷川 一 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト型モノクローナル抗体およびそれをコードする遺伝子、ハイブリドーマ並びに抗腫瘍剤

(57)【要約】

【構成】 癌患者癌所属リンパ節由来リンパ球とマウスミエローマ細胞との融合により得られるハイブリドーマから、癌細胞の膜表面を認識する新規なヒト型モノクローナル抗体を産生させる。該抗体をコードするcDNAをクローニングして、そのDNA配列およびそれより推定されるアミノ酸配列を決定する。該抗体を腫瘍細胞に対する毒素または抗癌剤を内包するリボソームの表面に担持することにより、抗腫瘍剤が得られる。

【効果】 本発明で得られたヒト型モノクローナル抗体を用いることにより、癌組織に対する抗癌剤、毒素等のターゲッティング治療が可能である。また、本発明の抗腫瘍剤は、ヒト型モノクローナル抗体を含むので、癌組織に特異的であり、連続投与が可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 癌患者由来リンパ球とマウスミエローマ細胞との細胞融合により産生され、癌細胞の膜表面抗原に特異的に結合するヒト型モノクローナル抗体。

【請求項2】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号13、14および15のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号16、17および18のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が、配列表の配列番号19、20および21のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、夫々、配列表の配列番号5および6のアミノ酸配列で表されることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号22、23および24のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が、配列表の配列番号25、26および27のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、夫々、配列表の配列番号11および12のアミノ酸配列で表されることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】 請求項1に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項8】 請求項2に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項9】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号28、29および30の塩基配列を含むことを特徴とする請求項8記載のDNA。

【請求項10】 請求項3に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項11】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号31、32および33の塩基配列を含み、かつ軽鎖可変領域が、配列表の配列番号34、35および36の塩基配列を含むことを特徴とする請求項10記載のモノクローナル抗体。

【請求項12】 請求項4に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項13】 重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、夫々、配列表の配列番号3および4の塩基配列で表されることを特徴とする請求項12記載のDNA。

【請求項14】 請求項5に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項15】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号37、38および39の塩基配列を含み、かつ軽鎖可変領域が、配列表の配列番号40、41および42の塩基配列を含むことを特徴とする請求項14記載のモノクロー

ナル抗体。

【請求項16】 請求項6に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項17】 重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、夫々、配列表の配列番号9および10の塩基配列で表されることを特徴とする請求項16記載のDNA。

【請求項18】 請求項1に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項19】 請求項2に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項20】 請求項3に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項21】 請求項4に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項22】 請求項5に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項23】 請求項6に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項24】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項1記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項25】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項2記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項26】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項3記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項27】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項4記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項28】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項5記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項29】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項6記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、癌の診断、治療に使用し得る新規なモノクローナル抗体、それをコードするDNAおよびその抗体を産生するハイブリドーマ並びに該抗体と制癌剤等を封入したリボソームとを結合させることにより得られる抗腫瘍剤に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、固形癌に治療薬として十分な効果を示す抗癌剤は存在しない。一方、古くから薬剤を適用組織、器官に集中させその効果を高めるターゲティングという概念があり、この手法により癌に対して特異的に薬物を集中できれば固形癌の治療も可能ではないかと予想されてきた。量産可能なマウスモノクローナル抗体の

作成法が確立(ミルシュタイン&ケーラー、Nature、1975)されて以来、その特異性を利用して抗癌剤、毒素等を癌組織に集積させる試みが多数なされ、その効果が認められてきている。

【0003】これまで抗体と薬剤の結合は、化学的に薬剤を修飾して結合する方法、すなわち抗体と薬剤を直接結合する方法や、デキストラン等の水溶性高分子を介し結合する方法等が試みられている。しかし、それらの方法では抗体1分子あたりに結合できる薬剤量が少ないこと、また薬剤の修飾により活性が低下するなどの問題が指摘されている。

【0004】一方、薬剤を修飾することなく大量に運ぶ手段として、リボソームに薬剤を封入しその表面に抗体を結合する方法、すなわち抗体結合リボソームが提案されており、その優れた抗腫瘍効果が多数報告されてきた〔今野ら、Cancer Research 47, 4471 (1987)、橋本ら、特開昭58-134032号公報〕。

【0005】

【発明が解決しようとする問題点】しかしながら、抗体に関しては、実際の治療においては、免疫応答に起因するアナフィラキシーなどの副作用から、連続投与が難しいとされるマウスモノクローナル抗体〔A. Lo Bugliら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 4220, (1989)〕に対し、ヒト型モノクローナル抗体の使用がより好ましいとされている。ところが、ヒト型モノクローナル抗体の作成法はマウスモノクローナル抗体の作成法と比較し、目的とする抗体を産生するヒトB細胞を効率的に得るための能動的免疫法が困難であること、抗体産生細胞を無限増殖化させる効率的方法が確立されていないことなどから、未だ十分に腫瘍細胞に反応するヒト型モノクローナル抗体を取得することは、困難な状況にある。

【0006】

【問題点を解決するための手段】本発明者らは、上記のような問題のない、癌組織に対し抗癌剤、毒素等のターゲティング治療を可能とするためのヒト型モノクローナル抗体を提供すべく鋭意検討した結果、特に癌細胞の膜表面にその抗原を持つ新規なヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製し、さらに該抗体を抗癌剤等を封入したリボソームに結合させることにより、ターゲティング療法に有効に使用し得る抗腫瘍剤が得られることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明の要旨は、癌患者由来リンパ球とマウスミエローマ細胞との融合細胞により産生され、癌細胞の膜表面抗原に特異的に結合するヒト型モノクローナル抗体およびそれをコードする遺伝子、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ並びに該モノクローナル抗体を含有する抗腫瘍剤に存する。本発明

のヒト型モノクローナル抗体は、例えば、重鎖可変領域が配列表の配列番号13、14および15のアミノ酸配列を含むものが挙げられ、より具体的には重鎖可変領域が配列表の配列番号16、17および18のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が配列表の配列番号19、20および21のアミノ酸配列を含むものや、重鎖可変領域が配列表の配列番号22、23および24のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が配列表の配列番号25、26および27のアミノ酸配列を含むもの等が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。もとより、本発明においては、上記抗原との反応性を損なわない範囲で一部のアミノ酸を置換、挿入、削除あるいは追加する等の改変を行ったものも本発明のモノクローナル抗体に含まれる。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に係るハイブリドーマは、A. Imamらの方法〔Cancer Research 45, 263 (1985)〕に準じて、まず、癌患者から摘出された癌所属のリンパ節から、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールを用いてマウスミエローマ細胞と融合して得られる。得られたハイブリドーマの上清を用いて、パラフォルムアルデヒド固定した各種癌細胞株に対し、エンザイム免疫アッセイにより陽性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択し、クローニングを行う。

【0009】さらに、ハイブリドーマの上清から、常法〔R. C. Duhamelら、J. Immunol. Methods 31, 211 (1979)〕によりモノクローナル抗体を精製、蛍光物質でラベルし、生癌細胞株、各種の赤血球、白血球等に対する反応性をフローサイトメトリーで検出することにより、制癌細胞株に対しては反応性を示す抗体を、赤血球、白血球に対しては、反応性を示さない抗体を選別する。また、癌患者から摘出される癌組織から単離される癌細胞、および同一患者の同一組織の非癌部から単離される正常細胞に対する反応性を比較して、癌細胞に、より多量の抗体が結合し、正常細胞には反応がないか、もしくは健康人由来の抗体と同程度の反応性しかない抗体を選別する。

【0010】かくして選別されたハイブリドーマが産生する抗体をコードするDNAの塩基配列は、たとえば、以下の方法によって得られる。抗体産生ハイブリドーマから、チオシアン酸グアニジン塩化リチウム法〔Casaraら、DNA, 2, 329 (1983)〕でmRNAを調製して、オリゴ(dT)プライマーを用いてそのcDNAライブラリーを作製する。次いで、cDNAに(dG)テーリングを行い、このdGテールにハイブリダイズするポリCと、既に遺伝子が取得されているヒト抗体重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の各々共通な配列部分をプローブとしてPCR法によって、抗体をコードするcDNAを増幅させる。その後、DNAの末端平滑化を行い、電気泳動法によってゲルから切りだしたDNAをp

UC119等のクローニングベクターに挿入し、Sangerらのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463, (1977)〕によってその塩基配列が決定される。

【0011】その結果、本発明の抗体は、例えば、重鎖可変領域が配列表の配列番号13、14および15のアミノ酸配列を含むものが挙げられ、具体的には重鎖可変領域が配列表の配列番号16、17および18のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が配列表の配列番号19、20および21のアミノ酸配列を含むものや、重鎖可変領域が配列表の配列番号22、23および24のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が配列表の配列番号25、26および27のアミノ酸配列を含むもの等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0012】配列表の配列番号13、14および15のアミノ酸配列は、16、17および18のアミノ酸配列、22、23および24のアミノ酸配列は、重鎖可変領域の中でも「超可変領域」と呼ばれ、同様に配列表の配列番号19、20および21のアミノ酸配列、25、26および27のアミノ酸配列は、軽鎖可変領域の中でも「超可変領域」と呼ばれる。かかる領域は、免疫グロブリンの抗体としての特異性、抗原決定基と抗体の結合親和性を決定するものである。従って本願発明においては、かかる超可変領域以外の重鎖可変領域は他の抗体由来であっても構わない。

【0013】本願発明において特に好適なモノクローナル抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が夫々配列表の配列番号5および6のアミノ酸配列で表されるもの、並びに配列番号11および12のアミノ酸配列で表されるものである。重鎖および軽鎖の定常領域の塩基配列はNucleic Acids Research 14, 1779 (1986)、The Journal of Biological Chemistry 257, 1516 (1982)およびCell 22, 197 (1980)に記載のものと同一配列を有する。

【0014】本抗体は、本抗体を産生するハイブリドーマを牛胎児血清含有eRDF、RPMI 1640培養液等を用いて培養するか、または、配列表の配列番号3および4、もしくは9および10等の塩基配列で表される可変領域をコードするDNAにさらに重鎖および軽鎖の定常領域をコードするDNAが夫々連結された遺伝子を化学合成し、その遺伝子の発現を可能とする公知の種々の発現ベクター、例えば、動物細胞における発現ベクターとして、pKCRH2〔三品ら、Nature, 307, 605, (1984)〕から図1または図2に示した手順で構築することができるpKCR(ΔE)/HとpKCRDに挿入し、CHO細胞(チャイニーズハイスター 卵巣細胞)等の宿主中で発現させることにより得ることができる。例えば、重鎖遺伝子の両端にHind III部位を付加したものをpKCR(ΔE)/H

のHind III部位に挿入し、またこのプラスミドのSal I部位にDHFR遺伝子等の選択マーカー遺伝子を挿入する。一方、軽鎖遺伝子の両端にはEcoRI部位を付加したものをpKCRDのEcoRI部位に挿入し、さらにこのプラスミドのSal I部位にもDHFR遺伝子を挿入する。両プラスミドをCHOdhfr<sup>-</sup>〔Urlaub G. & Chasin L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77, 4216 (1980)〕等の細胞にリン酸カルシウム法で導入し、ヌクレオチドを含まないαMEM培養液等で増殖する細胞から、さらに抗体を産生する細胞を選別することによって得ることができる。抗体は、これらの細胞を培養した培養液から、Protein-Aをセルロフィン、アガロース等の支持体に結合させたカラム等に吸着し、溶出させること等によって精製される。

【0015】本発明の抗腫瘍剤において、上記抗体を担持するリボソームは二重の脂質層からなり、該脂質層が①多重層になったもの、あるいは②一層のものいずれも使用することができる。構成成分としては、フォスファチジルコリン、コレステロール、フォスファチジルエタノールアミン、さらに電荷をあたえる物質としてのフォスファチジン酸等が用いられる。例えば、構成成分の使用割合として、フォスファチジルコリン1molに対しコレステロールは0.3~1mol、好ましくは0.4~0.6mol、フォスファチジルエタノールアミンは0.01~0.2mol好ましくは0.02~0.1mol、フォスファチジン酸は0~0.4mol好ましくは0~0.15molの組成比を用いることができる。リボソームの製造方法には公知の方法を用いることができる。たとえば溶媒を除去した脂質混合物をホモジナイザー等で乳化し、凍結融解後、マルチラメラリボソームを得る。さらに適当な粒径に調整するために超音波処理、高速ホモジナイズ、あるいは均一ポアを持つメンブランで加圧ろ過する方法〔Hope M. J. ら Biochimica et Biophysica Acta 812, 55 (1985)〕等で調整する。この時、好ましいサイズとして30nmから200nmのリボソームが選択される。

【0016】リボソームに内封させる薬剤としては、アドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エビルピシン、メトトレキセート、5Fu、マクラシノマイシン等の抗癌剤、リシンA、ジフテリアトキシン等の毒素、アンチセンスRNA等を用いることができる。薬剤の封入は、脂質を薬剤水溶液で水和することでリボソームに封入することができる。またアドリアマイシン、ダウノマイシン、エビルピシンについては、pH勾配を利用したリモートローディング法〔Lawrence D. M. ら Cancer Research 49, 5922 (1989)〕を

用いて封入することもできる。

【0017】このリボソーム表面上にモノクローナル抗体を結合させる方法としては、精製固体に疎水性の物質をつけることでリボソームに挿入させる方法、ホスファチジルエタノールアミンと抗体をグルタールで架橋させる方法等もあるが、好適には、抗体をチオール化した後、マレイミド基を導入した脂質を含むリボソームを作製し、制癌剤または腫瘍細胞に対する毒素を封入したマレイミド基を有するリボソームと反応させることによってリボソームの表面に結合することができる。また、残

存マレイミド基には、チオール化したポリアルキレングリコール部分を含む化合物等を反応させることによってリボソームの表面修飾を行うことも可能である。

【0018】抗体へのチオール基の付与は、固体のアミノ基に対し通常タンパク質のチオール化に用いるN-スクシンイミジル-3-(2-ビリジリジチオ)プロピオネート(SPD P)や、イミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート等の化合物を用いて行う方法、または抗体の内在性ジチオール基を還元してチオール基とする方法が用いられるが、内在性チオール基を用いる方法が

活性維持の点からより好ましい。抗体は、ペプシン等の酵素でF(ab)′化し、さらにジチオスレイトール(DTT)等で還元し、F(ab)′化して新たに生ずる1~3個のチオール基をリボソームとの結合反応に供することができる。マレイミド基含有リボソームとチオール化抗体の結合は中性の緩衝液(pH6.5~7.5)中、2~16時間反応することで達成される。

【0019】本発明の抗腫瘍剤の製剤化には、公知の方法つまり、脱水法(特表平2-502348号公報)、安定化剤を加え液剤として用いる方法(特開昭64-9331号公報)、凍結乾燥法(特開昭64-9931号公報)等の製剤化法を用いることができる。本発明の抗腫瘍剤は、血管内投与法や、腹腔内等、局所投与法で用いることができ、その投与量は、リボソームに含有された薬剤によって、それぞれ最適な量とすることができる。アドリアマイシン封入体を例に取れば投与量はアドリアマイシン量として50mg/kg以下、好ましくは10mg/kg以下、より好ましくは5mg/kg以下で用いることができる。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明についてより詳細に説明するが、その要旨を越えない限り以下に限定されるものではない。

【0021】実施例1

(癌患者癌所属リンパ節由来リンパ球とマウスミエローマとの細胞融合によるヒト型モノクローナル抗体GAH産生株の樹立)

(1)リンパ球の調製

大腸癌患者から摘出された癌所属リンパ節をハサミとメスによって細かくほぐし、さらに培養液A(eRDF

〔極東製薬工業社製〕+50μg/mlゲンタマイシン硫酸塩)中でステンレスネットを用いて細胞を分散させた。この細胞懸濁液を1000rpmで10分間遠心分離して上清を除去し、さらに新鮮な培養液Aに懸濁して遠心洗浄を行い、最終的に $2.6 \times 10^7$ 個の細胞を得た。

【0022】(2)細胞融合

リンパ球は、ポリエチレングリコール(ベーリンガー/マンハイム社製)を用いマウスミエローマ細胞( $1 \times 10^7$ 細胞)と常法に従い融合した。融合した細胞は、培養液Aに10μMヒポキサンチン、0.04μMアミノプテリン、1.6μMチミジン、10%ウシ胎児血清(FCS)を添加した培養液(HAT添加培養液)にリンパ球数が $5.4 \times 10^5$ /mlの密度になるよう懸濁し、100μlずつ96ウェルプレートに接種し、37℃でCO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養した。培養液は、適時、半量ずつ上記のHAT添加培養液で置換してハイブリドーマのコロニーが出現するまで培養を行った。ハイブリドーマのコロニーの出現は、すべてのウェルに確認された。各ウェルの培養上清について、下記試験例1の方法に従い、固定癌細胞株、即ち、大腸癌株C-1〔佐藤ら、医学のあゆみ、96、876、(1976)〕〔免疫生物研究所から入手〕、胃癌株MKN45〔内藤ら、癌と化学療法、5、89、(1978)〕〔免疫生物研究所から入手〕に対する反応性を測定した。陽性ウェルの出現率は、C-1株に対しては、7.3%(35ウェル)、MKN45株に対しては、4.6%(22ウェル)であり、両細胞株に反応性を示したウェルは、6ウェルであった。この両細胞株に反応性が認められたウェルのうちから、ハイブリドーマのクローニングを行った。クローニングは、限界希釈法により、3回行ない、ハイブリドーマクローンGAHを樹立した。

【0023】実施例2

(モノクローナル抗体GAHの精製と標識化)

(1)ハイブリドーマGAHの培養とモノクローナルGAH抗体の精製

牛胎児血清をプロテインA-アガロース〔レプリゲン社製〕カラムにかけ、そのカラムを素通りさせてプロテインA-アガロースカラムに吸着する物質を除去した血清を作成した。ハイブリドーマGAHの培養には、この血清を3%添加したeRDF〔極東製薬社製〕培養液を用いた。GAH抗体は、ハイブリドーマGAHを培養した培養液をプロテインA-アガロースカラムにかけ、抗体を吸着させ、その後溶出させることによって精製した。上記の血清を培養に用いることによって、血清由来の抗体、プロテインA-アガロースに吸着する物質の混入がない精製GAH抗体が得られた。GAH抗体は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で純粋なIgGであることが確認された。

## 【0024】(2) GAH抗体の蛍光標識化

精製したGAH抗体に、Coons A. H. の方法により、蛍光物質であるFITC（フルオレセインイソチオシアネート）を標識した。炭酸緩衝液（pH9.5）に抗体を透析し、FITC溶液を反応させた後、ゲル濾過法によって蛍光標識された抗体と遊離のFITCを分離した。蛍光標識された抗体が回収されてきた画分の吸光度、 $OD_{490nm}$ と $OD_{280nm}$ を測定し、標識率を算出した。標識抗体の抗体とFITCの結合モル比（F/P比）は、0.93であった。

## 【0025】試験例1

（ヒト型モノクローナル抗体の癌細胞株への反応性の検討）

## （1）癌細胞株と維持

ヒト癌細胞株として、大腸癌株C-1、胃癌株MKN45の各細胞株を用いた。これらの細胞株は、培養液B（10%FCS含有eRDF）で37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件で維持、増殖させた。

## 【0026】(2) 癌細胞株に対する反応性の検討

a. 固定癌細胞株を用いた反応性の測定  
癌細胞株は、96ウェルプレートで3日から4日間、一層になるまで培養を行い、上清を除去後、10mMリン酸緩衝液pH7.4、0.15M NaCl溶液（PBS）で2回洗浄したのち、2%-バラホルムアルデヒド固定（室温、20分）を行った。PBSで5回洗浄したのち、5%-BSA（牛血清アルブミン）含有PBS溶液を200μl/ウェル入れ、37℃、2時間放置し、ブロッキングを行った。このプレートをPBSで5回洗浄し、これに50μlのハイブリドーマ培養上清を加えた。37℃、2時間反応させたのち、PBSで5回洗浄し、50μlのアルカリホスファターゼを結合したヒト抗体に対するヤギ抗体（1000倍希釈、カベル社製）を加え、37℃、1時間の反応を行った。反応後、PBSで5回洗浄したのち、25mM p-ニトロフェニルホスフェート含有0.05M炭酸塩緩衝液-1mM\*

\* MgCl（pH9.5）を50μl/ウェル加え、室温で1時間ないし一夜反応させたのち、405nmにおける吸光度をマイクロプレートフォトメーター（コロナ社製）によって測定した。上記実施例1の（2）の通り、反応性を検討した培養癌細胞株、C-1、MKN45に陽性が確認できたウェルからクローニングを行い、ハイブリドーマ株GAHを得た。GAHの培養上清から精製した抗体についても同様の反応性が得られた。

## 【0027】b. 生癌細胞に対する反応性

10 フラスコまたはシャーレで培養した癌細胞の上清を除去し、0.02%-EDTA含有PBS溶液を加えて室温30分放置し、細胞を浮遊化させた。この細胞は、培養液Bで遠心洗浄し、約 $1 \times 10^5$ /200μlの細胞密度となるよう、上記実施例2の（2）で得た蛍光標識したGAH抗体（最終濃度50μg/ml）を含有する血清（健康人由来）に懸濁し、0℃、60分間反応させた。その後、2000rpmで2分間遠心して上清を除去し、さらに細胞を1mlのPBSに懸濁して遠心洗浄を行なった後、細胞を10μg/mlのプロビジウムアイオダイド（PI）を含有するPBS300μlに懸濁した。この細胞懸濁液をフローサイトメーター（FCM）、FACS440（ベクトン・ディッキンソン社製）にかけ、細胞個々に結合した蛍光量（FITC及びPI）を測定した。系に含まれていた死細胞には、PIが取り込まれてその核酸中に入り込み、PIの蛍光を発するので、データ処理上PIの蛍光を持つ死細胞群を除去することができる。蛍光量（5種）のマーカー（クオンタティブキット）（オーソ・ダイアグノスティックシステムズ社製）をFCMに同一条件下でかけ、それを指標にして細胞1個当たりの平均結合FITC量を算定し、その値と、実施例2の（2）で算出した標識抗体のF/P比から、生癌細胞の1個当たりの平均結合抗体数を算定し、その結果を表1に示した。

## 【0028】

## 【表1】

表 1

癌細胞株	抗 体	
	GAH	Control IgG
MKN45	$3.5 \times 10^4$	$0.15 \times 10^4$
C-1	$0.6 \times 10^4$	$< 0.1 \times 10^4$

GAH抗体を用いた場合、胃癌細胞株、大腸癌細胞株に対し、コントロールとして用いた健康人血清由来IgG抗体（GAHと同様の方法によって蛍光標識化した）の約6～23倍量の抗体が結合した。

## 【0029】試験例2

（ヒト型モノクローナル抗体GAHの血液系細胞に対する

反応性）健康人7名および癌患者3名の抹消血から、木下の方法〔赤血球系細胞の分離、新版日本血液学全書13, 800（1979）〕によって、赤血球を分離した。白血球については、健康人抹消血をヘパリンを加えて採血し、10mlに対して2mlの6%デキストラン生理食塩水溶液を加え、混合し、室温で50分放置し



て血漿層を得、1500rpm、5分間の遠心によって白血球を得た。これらの細胞に対する反応性は、生癌細胞株に対する反応性を測定した方法と同様、FCMによって測定した。ただしPIは無添加である。白血球については、さらにFCMでの細胞の前方散乱と側方散乱から、主細胞種である、小リンパ球 (lymphocyte \*

表 2

\*e)、顆粒球 (granulocyte)、単球 (monocyte)、血小板の群に分け [Bio/Technology 3, 337 (1985)]、それぞれに対する反応性を調べた。結果を表2に示した。

【0030】

【表2】

細胞	抗体	
	GAH	Control IgG
白血球		
小リンパ球	陰性	陰性
顆粒球	$0.49 \times 10^{**}$	$0.48 \times 10^{**}$
単球	$0.41 \times 10^{**}$	$0.43 \times 10^{**}$
血小板	陰性	陰性
赤血球 (10種)	陰性	陰性

\*：細胞1個当たりの平均抗体結合数

GAH抗体は、赤血球、小リンパ球には反応性が認められなかった。顆粒球、単球については、コントロール抗体 (試験例1と同様) の反応性と同等であった。

【0031】試験例3

(ヒト型モノクローナル抗体GAHの新鮮癌組織、非癌部組織由来細胞に対する反応性) GAH抗体の癌細胞結合特異性を検討するため、癌患者の癌組織と同時に摘出された同一患者、同一臓器の新鮮組織から、細胞を単離し、それぞれの細胞に対するGAH抗体の反応性を測定した。組織からの細胞の単離は、時田らの方法 [癌の臨床, 32, 1803 (1986)] に従った。組織をゴム板の上に敷いたテフロンシートにのせ、カミソリで叩※

表 3

抗体	大腸癌		胃癌 (Borr.IV)	
	癌	非癌	癌	非癌
GAH	$1.1 \times 10^4$	$0.03 \times 10^4$	$180 \times 10^4$	$4.6 \times 10^4$
Control IgG	$0.15 \times 10^4$	$0.04 \times 10^4$	$3.5 \times 10^4$	$0.9 \times 10^4$

\*：いずれも細胞1個あたりの平均抗体結合数を示す。

GAH抗体の癌組織由来細胞に対する平均結合抗体数は、非癌部由来細胞に対する結合数と比較して顕著に多く、また、コントロール抗体と比較した場合でも胃癌で51倍、大腸癌で7倍であり、GAH抗体が癌細胞の膜上により多く出現してくる抗原を認識していることが示唆された。

【0033】実施例3

※いて細切し、1mmのステンレスメッシュに移し、培養液をいれたシャーレのなかでふるい、メッシュを通過した微小細胞集塊のはいた液を1000rpmで遠心し、浮遊した脂肪と懸濁した壊死部分を捨て、遠心洗浄を繰り返した。細胞塊を23ゲージのカテラン針につけた注射器でパンピングして分散した。この様にして得られた細胞に対する反応性は、上記した生癌細胞株に対する反応性を検討した場合と同様、FCMによって測定した。結果を表3に示した。

【0032】

【表3】

(ヒト型モノクローナル抗体GAH軽鎖のサブクラス決定) 実施例2の(1)で得られたGAH抗体を還元状態でSDS-PAGEを行い、重鎖と軽鎖に分離して泳動されたタンパクをトランスファーメンブレン (Polyvinylidene difluoride膜) [ミリポア社製] にプロットし、この膜を5%BSA溶液でブロッキングした後、ヒトκ鎖、またはヒトλ鎖に

対するヤギ抗体にパーオキシダーゼが結合したもの〔カベル社製〕を反応させた。洗浄後、酵素基質として0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有0.05% (w/v) 4-クロロナフトール溶液を反応させた。その結果、GAH抗体の軽鎖は、抗ヒトκ鎖抗体と反応し、発色によってバンドが出現し、κ鎖であることが示された。

【0034】(ヒト型モノクローナル抗体GAH遺伝子の取得と塩基配列の決定)

a. ポリメラーゼチェーン反応(以下、PCRと略す)法による抗体GAHをコードするcDNAの調製

実施例1の(2)で得られたGAH抗体産生ハイブリドーマよりチオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法(DNA 2, 329 (1983))に従いポリ(A)を有するRNAを下記の如く調製した。ハイブリドーマ1×10<sup>7</sup>の細胞を5Mチオシアン酸グアニジン、1.0mM EDTA、50mMトリス-塩酸(pH7)および8% (v/v) β-メルカプトエタノールからなる溶液7.5mlに可溶化し、さらに、1g/2.5mlになるよう塩化セシウムを加え、混合した。この可溶化物8.0mlを遠心管に入っている5.7M塩化セシウム溶液3.5ml上に静かにのせ、Hitachi RPS40Tローターにて30,000rpm、23.5時間遠心後RNAを沈澱として回収した。このRNAの沈澱を0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、1mM EDTA、10mMトリス-塩酸(pH7.5)からなる溶液400μlに溶解しフェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈澱により回収した。得られたRNA約64μgを10mMトリス-塩酸(pH8.0)および1mM EDTAからなる溶液40μlに溶かした。このうち21μlからmRNAビューリフィケーションキット〔ファルマシア(Pharmacia)社製〕によって、ポリ(A)を有するmRNA約2.64μgを得た。

【0035】このポリ(A)mRNA 1.1μgを10μlの水に溶かし、オリゴd(T)12-18プライマー〔ファルマシア社製〕1.5μg、10mM 4dNTP〔宝酒造社製〕3μl、逆転写酵素〔ライフサイエンス(Life Science)社製〕40u、RNA分解酵素阻害剤〔宝酒造社製〕30u、5倍濃度の逆転写酵素緩衝液〔250mMトリス-塩酸(pH8.3)、40mM塩化マグネシウム、250mM塩化カリウム〕6μlを加え、水を加えて計30μlの系とし、41℃で1時間反応させた。上記反応液からエタノール沈澱を行って、cDNAを得た。

【0036】得られたcDNAを15.3μlの水に溶解した。この溶液に、5倍濃度の末端デオキシヌクレオチド転位酵素緩衝液〔250mMトリス-塩酸(pH7.5)、50mM塩化マグネシウム〕4.8μl、末端デオキシヌクレオチド転位酵素〔ファルマシア社製〕12u、10mM dGTP〔宝酒造社製〕2.4μl

を加え、計24μlの系とし、37℃で1.5時間反応させて、cDNAの3'末端にポリd(G)を付加した。その後70℃で15分間加熱して酵素を失活させた。

【0037】この様にして得られたcDNAを基質としてPCRを行った。PCRは、パーキン エルマー シータス ディー エヌ エー サーマル サイ클ー(Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler)を使用し、使用説明書に基づいて行った。すなわち上記反応終了液2μlに重鎖の可変領域をコードするcDNAを増幅させるためのプライマーとしてcDNA 3'末端に付加したdGテールにハイブリダイズするポリC(15ヌクレオチド)40pmolesと、ヒトIgG抗体ですべて共通である。可変領域の一部(配列番号:5のアミノ酸配列の113番~119番)から定常領域にまたがる領域に対応する一鎖DNAプライマー(配列番号:1, 37ヌクレオチド)〔Nucleic Acids Research 14, 1779 (1986)〕25pmoles、また、軽鎖の可変領域をコードするcDNAを増幅させるためのプライマーとしてポリC 40pmolesと、ヒトκ鎖のJ領域の一部(配列番号:6のアミノ酸配列の113番~114番)から定常領域にまたがる領域に対応する一鎖DNAプライマー(配列番号:2, 21ヌクレオチド)〔The Journal of Biological Chemistry 257, 1516 (1982)、Cell 22, 197 (1980)〕40pmoles、10倍濃度のPCR緩衝液〔100mMトリス-塩酸(pH8.3)、500mM塩化カリウム、15mM塩化マグネシウム、0.1% (w/v)ゼラチン〕10μl、10mM 4dNTP〔宝酒造社製〕2μl、Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5uに、水を加え、100μlの系とした。反応は、94℃、1分間(変性ステップ)、55℃、2分間(アニーリングステップ)、72℃、3分間(伸長ステップ)のインキュベーションを30サイクル行った後、さらに72℃、7分間インキュベーションを行った。得られた反応液をエタノール沈澱し、その沈澱物を30μlの水に溶かし、クレノー断片〔宝酒造社製〕2u、1mM 4dNTP 4μl、10倍濃度の末端平滑化緩衝液〔500mMトリス-塩酸(pH7.6)、100mM塩化マグネシウム〕4μlを加え、計40μlの反応系とし、37℃で30分間反応させ、2本鎖の平滑末端をもったcDNAを得た。

【0038】b. cDNAの塩基配列の決定  
得られたcDNA溶液を2%アガロース電気泳動により解析した結果、約500bpのバンドが認められた。この約500bpのバンドを常法に従ってアガロースゲルより切り出し、クローニングベクターのpUC119のSma I部位に挿入してジデオキシ法によってその塩基

配列を決定した。その結果、該PCRフラグメントの塩基配列中、重鎖及び軽鎖の変換領域をコードする塩基配列は、夫々、配列番号：3、配列番号：4に示したとおりであった。決定した塩基配列から予想される前記ハイブリドーマが産生するGAH抗体の重鎖及び軽鎖の変換領域のアミノ酸配列は、夫々、配列番号：5及び配列番号：6で示す通りである。また、塩基配列の結果から、GAH抗体のサブクラスはIgG1であることが判明した。このアミノ酸配列及び塩基配列が明らかにされたDNA断片は、上述の様な方法をくり返すことなく、DNA合成機により再現性よく取得することができる。

#### 【0039】実施例4

(癌患者癌所属リンパ節由来リンパ球とマウスミエローマとの細胞融合によるヒト型モノクローナル抗体1-3-1産生株の樹立)

##### (1) リンパ球の調製

肺癌患者から摘出された癌所属リンパ節から、実施例1の(1)と同様にしてリンパ球の調製を行い、最終的に $3 \times 10^7$ の細胞を得た。

##### 【0040】(2) 細胞融合

リンパ球は、ポリエチレングリコール(ペーリンガー/マンハイム社製)を用いマウスミエローマ細胞( $8 \times 10^5$ 細胞)と常法に従い融合した。融合した細胞は、実施例1の(2)と同様に、HAT添加培養液にリンパ球数が $5.2 \times 10^5 / \text{ml}$ の密度になるよう懸濁し、 $100 \mu\text{l}$ ずつ96ウェルプレートに接種し、適時、半量ずつ上記のHAT添加培養液で置換してハイブリドーマのコロニーが出現するまで培養を行った。ハイブリドーマのコロニーの出現は、すべてのウェルに確認された。各ウェルの培養上清について、実施例1の(2)と同様に試験例1の(2)のaに示した方法で、固定癌細胞株即ち大腸癌株C-1、胃癌株MKN45に対する反応性を測定した。陽性ウェルの出現率は、C-1株に対しては、16.3%(94ウェル)、MKN45株に対しては、16.3%(36ウェル)であり、両細胞株に反応性を示したウェルは、4ウェルであった。この両細胞株に反応性が認められたウェルのうちから、ハイブリドーマのクローニングを行った。クローニングは、限界希釈法により、3回行ない、ハイブリドーマクローン1-3-1を樹立した。

##### 【0041】実施例5

(モノクローナル抗体1-3-1の精製と標識化)

##### (1) ハイブリドーマ1-3-1の培養とモノクローナル抗体1-3-1の精製

ハイブリドーマ1-3-1の培養には、実施例2の

(1)に示した血清を3%添加したeRDF(極東製薬社製)培養液を用いた。1-3-1抗体は、ハイブリドーマ1-3-1を培養した培養液をブロテインA-アガロースカラムにかけ、抗体を吸着させ、その後溶出させることによって精製した。1-3-1抗体は、SDS-

PAGEで純粋なIgMであることが確認された。

【0042】(2) 1-3-1抗体の蛍光標識化  
精製した1-3-1抗体に、実施例2の(2)と同様にしてFITCを標識し、蛍光標識された抗体が回収されてきた画分の吸光度、 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ と $\text{OD}_{490\text{nm}}$ を測定し、標識率を算出した。F/P比は、6.7であった。

##### 【0043】試験例4

(ヒト型モノクローナル抗体の癌細胞株への反応性の検討)

##### (1) 癌細胞株と維持

ヒト大腸癌株C-1、胃癌株MKN45は、試験例1の(1)と同様、培養液Bで $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ の条件で維持、増殖させた。

##### 【0044】(2) 癌細胞株に対する反応性の検討 生癌細胞に対する反応性

フラスコまたはシャーレで培養した癌細胞の上清を除去し、0.02%-EDTA含有PBS溶液を加えて室温30分放置し、細胞を浮遊化させた。この細胞は、培養液Bで遠心洗浄し、約 $1 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$ の細胞密度となるよう、PBSに懸濁し、最終濃度が $5.0 \mu\text{g} / \text{ml}$ となるよう上記実施例5の(1)で得られた1-3-1抗体を加え、 $0^\circ\text{C}$ 、60分間反応させた。その後、 $2000 \text{rpm}$ で2分間遠心して上清を除去し、1%BSA含有PBSでFITC標識化抗ヒト抗体(カベル社製)を500倍に希釈した溶液、 $200 \mu\text{l}$ を添加して細胞を懸濁させ、さらに $0^\circ\text{C}$ 、60分間反応させた。反応後、 $2000 \text{rpm}$ で2分間遠心して上清を除去し、細胞を $1 \text{ml}$ のPBSに懸濁して遠心洗浄を行なった後、細胞を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のPIを含有するPBS  $300 \mu\text{l}$ に懸濁した。この細胞懸濁液をFCMにかけ、個々の細胞に結合した蛍光量(FITC及びPI)を測定した。1-3-1抗体の大腸癌細胞株C1、胃癌細胞株MKN45それぞれに対する反応性を図3及び図4に示した。横軸に癌細胞1個当たりの蛍光強度、縦軸に癌細胞数が示されている。コントロールとして、市販のヒトIgM抗体(カベル社製)を用い、同様に癌細胞株に対する反応性を調べた。図中、1-3-1抗体の反応性は点線で、コントロールは実線で示した。これより、1-3-1抗体は癌細胞に対し強い結合性を有することがわかる。

##### 【0045】試験例5

(ヒト型モノクローナル抗体1-3-1の新鮮癌組織、非癌部組織由来細胞に対する反応性) 1-3-1抗体の癌細胞結合特異性を検討するため、癌患者の癌組織と同時に摘出された同一患者、同一臓器の新鮮組織から、細胞を単離し、それぞれの細胞に対する1-3-1抗体の反応性を測定した。組織からの細胞の単離は、上記試験例3と同様時田らの方法に従った。この様にして得られた細胞に対する反応性は、上記した生癌細胞株に対する反応性を検討した場合と同様、FCMによって測定し

た。ただし、これらの細胞は、培養液Bで遠心洗浄し、約 $1 \times 10^5$  /  $200 \mu\text{l}$ の細胞密度となるよう、上記実施例5の(2)で得た蛍光標識した1-3-1抗体(最終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )を含有する血清(健康人由来)に懸濁し、 $0^\circ\text{C}$ 、60分間反応させた後、 $2000 \text{ rpm}$ で2分間遠心して上清を除去し、細胞を $1 \text{ ml}$ のPBSに懸濁して遠心洗浄を行ない、細胞を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のPIを含有するPBS $300 \mu\text{l}$ に懸濁した。その後、この細胞懸濁液をFCMにかけ、細胞個々に結合\*

表

\*した蛍光量(FITC及びPI)を測定した。蛍光量(5種類)のマーカー(クオンタティブキット:前述)をFCMに同一条件下でかけ、それを指標にして細胞1個当たりの平均結合FITC量を算定し、その値と実施例5の(2)で算出した標識抗体のF/P比から生癌細胞の1個当たりの平均結合抗体数を算定し、その結果を以下表4に示す。

【0046】

【表4】

4

抗体	大腸菌		胃癌	
	癌	非癌	癌	非癌
1-3-1	$1.5 \times 10^4$	$0.04 \times 10^4$	$1.8 \times 10^3$	$0.05 \times 10^3$
Control	$0.15 \times 10^4$	$0.04 \times 10^4$	$0.2 \times 10^3$	$0.3 \times 10^3$

1-3-1抗体の非癌部由来細胞に対する反応性は、コントロールとした健康人抹しょう血由来抗体(1-3-1と同様の方法により蛍光標識化)と同程度かそれ以下であったのに対し、癌組織由来細胞に対する平均結合抗体数は、非癌由来細胞に対する結合数と比較して顕著に多く、また、コントロール抗体と比較した場合には、胃癌、大腸癌とも10倍であり、1-3-1抗体が癌細胞の膜上により多く出現してくる抗原を認識していることが示唆された。

## 【0047】実施例6

(ヒト型モノクローナル抗体1-3-1軽鎖のサブクラス決定)抗体としてGAH抗体のかわりに、実施例5の(1)で得られた1-3-1抗体を用いた以外は、前記実施例3に示した方法と同様にして、1-3-1抗体軽鎖のサブクラスを決定した。その結果、1-3-1抗体の軽鎖は、抗ヒトλ鎖抗体と反応し、発色によってバンドが出現し、λ鎖であることが示された。

【0048】(ヒト型抗体1-3-1遺伝子の取得と塩基配列の決定)

a. ポリメラーゼチェーン反応(以下、PCRと略す)法による抗体1-3-1をコードするcDNAの調製  
実施例4の(2)で得られた1-3-1抗体産生ハイブリドーマよりチオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法(DNA-2, 3-2-9 (1983))に従いポリ(A)を有するRNAを調製した。用いたハイブリドーマの細胞数が $2 \times 10^5$ である以外は、すべて実施例3で示したとおりにして、該RNAを調製した。得られたRNA約 $1.8 \text{ mg}$ を $10 \text{ mM}$ トリス-塩酸(pH8.0)および $1 \text{ mM}$  EDTAからなる溶液 $1 \text{ ml}$ に溶かした。このうち $230 \mu\text{l}$ からmRNAビューリフィケーションキット(前述)によって、ポリ(A)を有するmRNA約 $20 \mu\text{g}$ を得た。

20

【0049】このポリ(A)mRNA  $4.3 \mu\text{g}$ を $100 \mu\text{l}$ の水に溶かし、実施例3と同様、オリゴd(T)12-18プライマー $0.6 \mu\text{g}$ 、 $10 \text{ mM}$  4dNTP  $2 \mu\text{l}$ 、逆転写酵素 $40 \text{ u}$ 、RNA分解酵素阻害剤 $30 \text{ u}$ 、5倍濃度の逆転写酵素緩衝液 $6 \mu\text{l}$ を加え、水を加えて計 $300 \mu\text{l}$ の系とし、 $42^\circ\text{C}$ で1時間反応させた。上記反応液からエタノール沈澱を行って、cDNAを得た。

30

【0050】得られたcDNAを $200 \mu\text{l}$ の水に溶解した。このうちの $10 \mu\text{l}$ に、5倍濃度の末端デオキシヌクレオチド転位酵素緩衝液 $5 \mu\text{l}$ 、末端デオキシヌクレオチド転位酵素 $11 \text{ u}$ 、 $10 \text{ mM}$  dGTP  $2.5 \mu\text{l}$ を加え、水 $6.5 \mu\text{l}$ を加え計 $25 \mu\text{l}$ の系とし、 $37^\circ\text{C}$ で1時間反応させて、cDNAの3'末端にポリd(G)を付加した。その後 $70^\circ\text{C}$ で10分間加熱して酵素を失活させた。

40

【0051】この様にして得られたcDNAを基質としてPCRを行った。PCRは、上記反応終了液 $2.5 \mu\text{l}$ に重鎖の可変領域をコードするcDNAを増幅させるためのプライマーとしてcDNA 3'末端に付加したdGテールにハイブリダイズするポリC(14ヌクレオチド)  $25 \text{ pmol}$ と、 $1 \text{ gM}$ の定常領域の塩基配列部分に対応する一鎖DNAプライマー(配列番号:7, 17ヌクレオチド)-[Nucleic Acids Research 18, 4278 (1990)]  $25 \text{ pmol}$ と、また、軽鎖の可変領域をコードするcDNAを増幅させるためのプライマーとしてポリC  $25 \text{ pmol}$ と、λ鎖の定常領域の塩基配列部分に対応する一鎖プライマー(配列番号:8, 19ヌクレオチド)-[Nature 294, 536 (1981)]  $25 \text{ pmol}$ を用いた以外はすべて実施例3で示した方法と同様に行い、本鎖の平滑末端をもったcDNAを得

50

た。

#### 【0052】b. cDNAの塩基配列の決定

得られたcDNA溶液を2%アガロース電気泳動により解析した結果、約500bpのバンドが認められた。この約500bpのバンドを常法に従ってアガロースゲルより切り出し、クローニングベクターのpUC119のSmaI部位に挿入してジデオキシ法によってその塩基配列を決定した。その結果、該PCRフラグメントの塩基配列中、重鎖及び軽鎖の変換領域をコードする塩基配列は、夫々、配列番号：9、配列番号：10に示したとおりであった。決定した塩基配列から予想される前記ハイブリドーマが産生する1-3-1抗体の重鎖及び軽鎖の変換領域のアミノ酸配列は、夫々、配列番号：11及び配列番号：12で示す通りである。このアミノ酸配列及び塩基配列が明らかにされたDNA断片は、上述のような方法を繰り返すことなく、DNA合成機により再現性よく取得することができる。

#### 【0053】実施例7

(アドリアマイシン含有GAH抗体結合リボソームの作製)

##### a. チオール化抗体の作製

抗腫瘍細胞反応性GAH抗体(IgG)を0.1M-酢酸緩衝液(pH4.0)で1/40mol量のペプシン[Cooper Biomedical社製]を加え、37℃で一夜反応させてF(ab')<sub>2</sub>とし、陽イオン交換樹脂(mono S)[ファルマシア社製]によるクロマト分離によってF(ab')<sub>2</sub>を単離した。分離条件は、0.1M 酢酸緩衝液(pH4.0)中、0から0.5M NaClを含有する同緩衝液の直線勾配により行った。単離されたF(ab')<sub>2</sub>を0.15M NaClを含む0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)中で、抗体1mgにつき10%DTT 12μlを加え、室温で80分間放置した。反応終了後、PBSに平衡化したゲルろ過カラム(PD-10)で脱塩し、チオール化F(ab')<sub>2</sub>抗体を調製した。

##### 【0054】b. チオール化ポリエチレングリコールの作製

L-シスチン48mgを0.4Mほう酸緩衝液10mlに溶解し、2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性化PEG2)[生化学工業社製]200mgを加え室温で一夜反応した。得られたシスチン結合PEGにDTT 62mgを加え37℃で6時間反応させることでシスチン結合PEGを含む溶液を得た。さらに反応液をゲル濾過(GH-25 生化学工業)等で脱塩し10mMリン酸緩衝液(pH7.4)、0.15M-NaCl(PBS)に置換した後PBSで平衡化したチオプロピルセファロース6B(ファルマシア)7mlに添加し、非結合物をPBSで洗浄除去した。ゲルに結合したシスチン結合PEGを、50mM-DTTを含むPBSで溶出後、ゲル濾過

等で余剰のDTTを脱塩除去し標品(チオール化PEG)を得た。

##### 【0055】c. マレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンの作製

ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン127mg、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド(EMCS)80mg、トリエチルアミン44μlをクロロホルム/メタノール：5/1の溶液に加え、窒素気流下で3時間反応させた。その後、さらに20mgのEMCSを追加しさらに室温で3時間反応させた。反応溶液のニンヒドリン反応が陰性になったことを確認後、減圧乾固し、少量のクロロホルムに再溶解した。マレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンはUNISIL[ガスクロ工業社製]を用いたクロマトグラフィーで精製した。クロロホルムで平衡化した同カラムに添加しクロロホルム/メタノール：10/1の溶離液で展開し目的物質を得た。

##### 【0056】d. マレイミド基含有アドリアマイシン封入リボソームの作製

DPPC(ジバルミトイルフォスファチジルコリン)/chol(コレステロール)/マレイミド化DPPE(ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン)が、18/10/3(mol比)からなる固形脂質混合物(日本精化社製)100mgに0.4Mクエン酸緩衝液pH4を1ml加え攪はんし、さらに凍結融解を5回繰り返し水和することによりマルチラメラリボソームを作製した。ついでマルチラメラリボソームを200nmのポアサイズをもつポリカーボネート膜[ヌクレオボア、マイクロサイエンス社製]を装着した加圧装置(extruder;Lipex Biomembranes)で60℃に加温しつつ10回加圧濾過を繰り返すことで製粒されたリボソームを得た。このリボソーム溶液を1M NaOH溶液で中和し60℃に加温しつつ脂質量の1/10重量のアドリアマイシン[協和発酵社製]を加えた。リボソーム内外のpH勾配に従って97%以上のアドリアマイシンが能動的にリボソームに封入され、マレイミド基含有アドリアマイシン封入リボソームが作製された。

【0057】e. マレイミド基含有アドリアマイシン封入リボソームへのチオール化抗体の結合とPEG修飾  
脂質100mgからなる上記マレイミド含有アドリアマイシン封入リボソームにチオール化F(ab')<sub>2</sub>抗体、5mgを加え、37℃で8時間反応させ、さらに5μmolのチオール化PEGを加え、PBS中室温で6時間反応させることによりPEG修飾抗体結合アドリアマイシン封入リボソームを作製した。さらにセファロースCL6B(ファルマシア社製)でゲル濾過し未反応のシスチン結合PEGを分離した。

##### 【0058】試験例6

(アドリアマイシン封入GAH抗体結合PEG修飾リボ

ソームの薬効確認) GAH抗体の反応性が認められ、またヌードマウス移植系で集積性が認められるヒト胃癌細胞株MKN45を用い抗腫瘍効果を検討した。治療実験は培養したMKN45細胞  $1 \times 10^5$  個をヌードマウス皮下に移植し、10日後、腫瘍重量が約100mgになった時点から開始した。結果を図5に示した。治療開始当日、3日および7日経過後にアドリアマイシン封入GAH抗体結合PEG修飾リボソームをアドリアマイシン換算で5mg/kg、尾静脈投与した(図中、◇で表示)。また、コントロール群としてリン酸緩衝生理食塩水(図中、◆で表示)、アドリアマイシン単独(図中、□で表示)、アドリアマイシン封入PEG修飾リボソーム(図中、×で表示)投与群(各群6~7匹)を設けた。その腫瘍増殖の経時変化を測定するため、パッセル-コロンバス法に従って腫瘍の短径×短径×長径/2の計算式で推定腫瘍重量を求め、その推移を治療開始時点での腫瘍重量を基準として示した。横軸は治療実験開始\*

## 配列

G GCC CTT GGT GGA GGC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TCT 37

【0061】配列番号: 2

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

ヒトIgG抗体

配列

## 配列

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GCG CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCA 45  
 CAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC 90  
 AGT TGT GGT TTC TAC TGG AAC TGG ATC CGC CAG CAC CCA GGG AAG 135  
 GGC CTG GAG TGG ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC 180  
 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTT ACC ATA TCG CTA GAC ACG 225  
 TCT AAG AGC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT CTG ACT GCC GCG 270  
 GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT CCG AGG TCT ACC CGA CTA CCG GGG 315  
 GCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA 357

【0063】配列番号: 4

配列の長さ: 342

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

## 配列

GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAG TCG CTG GCT GTG TCT CTG 45  
 GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA 90  
 TAC AAC TCC AAC AAT AAG AAA TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAG AAA 135  
 CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG 180  
 GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GCG ACA 225  
 GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA 270  
 GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG TTC GGC 315  
 CAA GCG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA 342

【0064】配列番号: 5

50 配列の長さ: 119

\*後の経過日数を示す。図中(↓)は薬剤投与日を示す。これよりアドリアマイシン封入モノクローナル抗体結合PEG修飾リボソームの強い抗腫瘍効果が示された。

【0059】

【発明の効果】本発明で得られたヒト型モノクローナル抗体を用いることにより、癌組織に対する抗癌剤、毒素等のターゲティング治療が可能である。また、本発明の抗腫瘍剤は、ヒト型モノクローナル抗体を含むので、癌組織に特異的であり、連続投与が可能である。

【0060】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 37

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

ヒトIgG抗体

20※ TGG TGC AGC CAC AGT TCG TTT

21

【0062】配列番号: 3

配列の長さ: 357

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

※ 細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

★配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

★40

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

\* 起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

\*

配列

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
 20 25 30  
 Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 35 40 45  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr  
 50 55 60  
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr  
 65 70 75  
 Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala  
 80 85 90  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Arg Leu Arg Gly  
 95 100 105  
 Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 119

【0065】配列番号：6

配列の長さ：114

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

※

配列

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu  
 20 25 30  
 Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 35 40 45  
 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 65 70 75  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
 80 85 90  
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly  
 95 100 105  
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 110 114

【0066】配列番号：7

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

ヒトIgM抗体

配列

C GAG GGG GAA AAG GGT T

17

【0067】配列番号：8

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

ヒトIgM抗体

配列G AAG CTC CTC AGA GGA GGG

19

【0068】配列番号：9

(14)

特開平5-304987

25

26

配列の長さ: 366

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

\* 起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

\*

配列

CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG 45  
 GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC 90  
 AGT AGT AGT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GCG AAG 135  
 GGG CTG GAG TCG ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC 180  
 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG 225  
 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA 270  
 GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT CCG AGG GGG AGC TAC GGG GGC TAC 315  
 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC 360  
 TCC TCA 366

【0069】配列番号: 10

配列の長さ: 324

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

※配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

※

配列

TAT GAG CTG ACA CAG CCA CCC TCG GTG TCA GTG TCC CCA GGA CAG 45  
 ACG GCC AGG ATC ACC TGC TCT GGA GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT 90  
 GCT TAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTG CTG GTG 135  
 ATA TAT AAA GAC AGT GAG AGG CCC TCA GGG ATC CCT GAG CGA TTC 180  
 TCT GGC TCC ACC TCA GGG ACA ACA GTC ACG TTG ACC ATC AGT GGA 225  
 GTC CAG CCA GAA GAC GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAA TCA GCA GAC 270  
 AGC AGT GGT ACT TAT GAG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC 315  
 GTC CTA GGT 324

【0070】配列番号: 11

配列の長さ: 122

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

★配列の種類: タンパク質

起源

30 細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

★

配列

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
 20 25 30  
 Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 35 40 45  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr  
 50 55 60  
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr  
 65 70 75  
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
 80 85 90  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Gly Tyr  
 95 100 105  
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 110 115 120

Ser Ser

122



【0071】配列番号: 12

配列の長さ: 108

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr  
 20 25 30  
 Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val  
 35 40 45  
 Ile Tyr Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly  
 65 70 75  
 Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp  
 80 85 90  
 Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr  
 95 100 105  
 Val Leu Gly

108

【0072】配列番号: 13

配列の長さ: 8

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Ile Ser Ser Xaa Xab Xac Tyr Trp  
 1 5

Xaa : Cys or Ser, Xab : Gly or Ser, Xac : Phe or Tyr

【0073】配列番号: 14

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

配列

Ile Gly Xaa Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr  
 1 5 10

Xaa : Tyr or Ser,

【0074】配列番号: 15

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

\* 配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

\* 胞

※ 配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

※

30 配列

Gly Xaa Asp Xab

1

Xaa : Ala or Met, Xab : Tyr or Val

【0075】配列番号: 16

配列の長さ: 9

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

40 細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

Ile Ser Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn

1

5

【0076】配列番号: 17

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

50 細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

(16)

特開平5-304987

29

30

配列

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr  
1 5 10

【0077】配列番号：18

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞 \*10

\*

配列

Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr  
1 5

【0078】配列番号：19

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala  
1 5 10 15

【0079】配列番号：20

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

※配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

20 胞

配列

Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp  
1 5 10

【0082】配列番号：23

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

30 細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

【0080】配列番号：21

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

【0081】配列番号：22

配列の長さ：10

※

配列

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro  
1 5 10

【0083】配列番号：24

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

40 配列

Gly Ser Tyr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10

【0084】配列番号：25

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

50 胞

31

## 配列

Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr

1

5

【0085】配列番号: 26

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞 10

## 配列

Lys Asp Ser Gln

1

【0086】配列番号: 27

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞 20

## 配列

ATT GGG WRY ATC TAT TAY AGT CGG ACC ACC TAC TAC 36

W: T or A, R: A or G, Y: C or T

【0089】配列番号: 30

配列の長さ: 12

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

※配列の種類: cDNA

起源

30 細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モ

※ ノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

## 配列

GGK RYK GAC KWC 12

K: G or T, R: G or A, Y: C or T

W: A or T

【0090】配列番号: 31

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

★

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

## 配列

ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT CGG ACC ACC TAC TAC 36

【0092】配列番号: 33

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

TCT ACC CGA CTA CGG CGG GCT GAC TAC 27

50 【0093】配列番号: 34

32

## \* 配列

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Val

1

5

10

【0087】配列番号: 28

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

## 配列

ATC AGC AGT WGT RGT TWC TAC TGG 28

W: T or A, R: G or A

【0088】配列番号: 29

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

配列の長さ: 51  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状

## 配列

AAG TCC ACC CAG AGT GTT TTA TAC AAC TCC AAC AAT AAG AAA TAC TTA GCT 51

【0094】配列番号: 35

配列の長さ: 21  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

TGG GCA TCT ACC CCG GAA TCC 21

【0095】配列番号: 36

配列の長さ: 27  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

CAG CAG TAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG 27

## 配列

ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG 42

【0098】配列番号: 39

配列の長さ: 36  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状

## 配列

CGG AGC TAC CCG GCG TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC 36

【0099】配列番号: 40

配列の長さ: 27  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

細胞配列GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT GCT TAT 27

【0100】配列番号: 41

配列の長さ: 12  
配列の型: 核酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: cDNA

## 配列

CAA TCA GCA GAC AGC AGT GGT ACT TAT GAG GTA 33

【図面の簡単な説明】

【図1】ベクターpKCRDの構築の概略図を示す。

【図2】ベクターpKCR(ΔE)/Hの構築の概略図を示す。

\* 配列の種類: cDNA

起源

\* 細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

※【0096】配列番号: 37

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

10 配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列

ATC ACC AGT AGT AGT TAC TAC TGG GGC TGG 30

【0097】

配列番号: 38 配列の長さ: 42

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

20 配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列

★ 配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

★ 細胞

☆ 起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列

AAA GAC AGT GAG 12

【0101】配列番号: 42

配列の長さ: 33

配列の型: 核酸

40 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

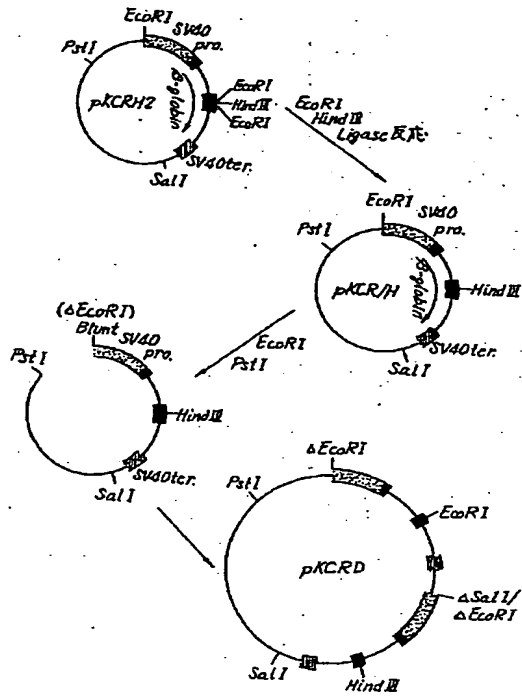
☆ 細胞

【図3】1-3-1抗体の大腸癌細胞株C1に対する反応性を示す。

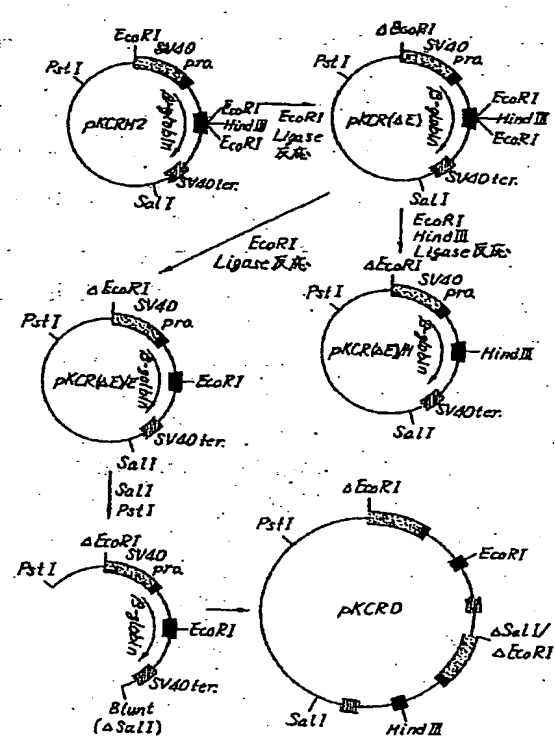
【図4】1-3-1抗体の胃癌細胞株MKN45に対する反応性を示す。

【図5】ヌードマウス移植癌に対するアドリマイシン \*を示す。  
封入GAH抗体結合PEG修飾リボソームの抗腫瘍効果\*

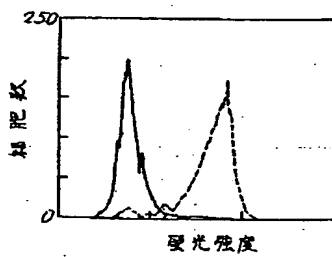
【図1】



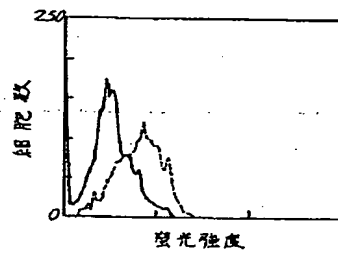
【図2】



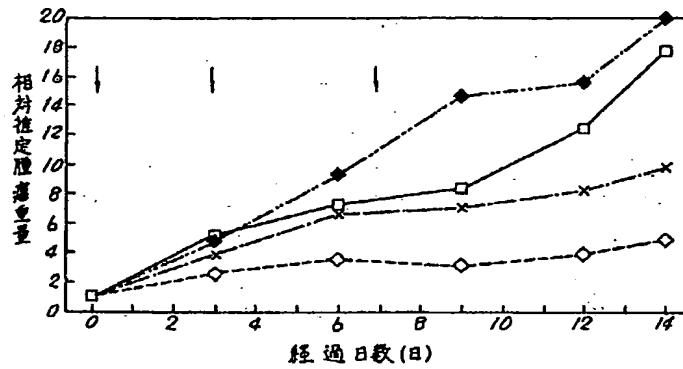
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/13	Z N A			
// A 6 1 B 10/00	T			
C 1 2 N 15/08				
G 0 1 N 33/577	B	9015-2J		
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	C

(72)発明者 伊藤 典彦  
 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三  
 菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 長池 一博  
 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三  
 菱化成株式会社総合研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

FORNIA MOBILE COURT 2011

**This Page Blank (uspto)**